

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07295

研究課題名(和文)シナプトネマ複合体構成因子SYCP3による減数分裂期組換えの制御機構解析

研究課題名(英文)The study of the synaptonemal complex component SYCP3 in meiotic recombination

研究代表者

小林 航(Wataru, Kobayashi)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：20778063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、シナプトネマ複合体構成因子SYCP3による減数分裂期組換えの制御機構の解明を目的とする。シナプトネマ複合体は減数分裂期組換えの推進に必須な染色体構造であるが、その実体は不明である。そこで本研究は、SYCP3によるRAD51およびDMC1の相同組換え反応の制御機構について生化学的・細胞生物学的解析を行った。解析の結果、SYCP3はRAD51とDMC1の相同的対合反応をそれぞれ負と正に制御することを発見した。さらに、SYCP3はHOP2-MND1複合体と競合し、RAD51に結合することでRAD51依存的な相同的対合反応を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism of meiotic recombination by the synaptonemal complex component SYCP3. The synaptonemal complex is essential for the progression of meiotic recombination. However, the functions of SYCP3 in meiotic recombination remain elusive. We performed the biochemical and cell biology analyses to elucidate the mechanism by which SYCP3 regulates RAD51- and DMC1- homologous pairing. We found that SYCP3 significantly suppresses the RAD51-mediated homologous pairing, but not DMC1-mediated homologous pairing. In addition, we found that SYCP3 specifically binds to RAD51 and suppresses RAD51-mediated homologous pairing by competing with HOP2-MND1 complex.

研究分野：生化学 構造生物学

キーワード：相同組換え シナプトネマ複合体 SYCP3 RAD51 DMC1 相同的対合

1. 研究開始当初の背景

生物の配偶子は減数分裂を経て形成される。その過程において、相同染色体間を連結するキアズマは、第一減数分裂期における正確な染色体分配を保證する。キアズマは減数分裂期組換えを介して形成され、その形成不全は染色体異数性に起因したダウン症や不妊症の原因となる。また、キアズマ形成による染色体の乗換えは相同染色体間の遺伝情報を一部交換するため、進化の原動力となったゲノム DNA の再編が引き起こされる。

RAD51 および DMC1 は、真核生物における相同組換えの中心酵素である。両者は DNA 二重鎖切断部位に形成された単鎖 DNA 上にフィラメント構造を形成した後に、無傷のターゲット二重鎖 DNA に結合することで、RAD51/DMC1-単鎖 DNA-二重鎖 DNA の三者複合体を形成する。この三者複合体中において、単鎖 DNA と相同な塩基配列が、二重鎖 DNA の中から検索される(相同鎖検索)。その後、相同な領域間において単鎖 DNA と二重鎖 DNA が対合し、ヘテロ二重鎖 DNA 領域が形成される(相同的対合)。興味深いことに、RAD51 は体細胞および減数分裂期の細胞に発現するのに対し、DMC1 は減数分裂期の細胞でのみ特異的に機能する(Shinohara et al., 1992, Cell; Bishop et al., 1992, Cell)。そのため、減数分裂期組換えでは、RAD51 と DMC1 がそれぞれ特化した役割を果たしていると考えられているが、両者の機能差異は未だ明らかでない。

減数分裂期特異的な染色体構造であるシナプトネマ複合体は、相同染色体同士を接着させる役割を担い、減数分裂期組換えの推進に必須である。減数分裂期でのシナプトネマ複合体の形成は、酵母からヒトに至るまで高度に保存されており、その形成不全は、染色体不分離を引き起こし、不妊症や染色体異常の原因となる。シナプトネマ複合体は、主に axial element、transverse filament、および central region の 3 つの領域から構成される。その内、axial element はクロマチンに結合する領域であり、SYCP3 はその主要な構成因子である。興味深いことに、シナプトネマ複合体構成の一つである SYCP3 は相同染色体間におけるキアズマ形成の促進に重要であることが示された(Li et al., 2011, Genetics)。しかし、SYCP3 が RAD51 と DMC1 による減数分裂期組換えに与える影響は全くわかっていない。

2. 研究の目的

シナプトネマ複合体が減数分裂期組換えの進行に必須であることは、遺伝学的解析および細胞生物学的解析によって示されている。しかし、シナプトネマ複合体構成因子を用いた生化学的解析が立ち遅れているため、シナプトネマ複合体中での相同組換え機構

については明らかにされていない。そこで本研究は、シナプトネマ複合体構成因子 SYCP3 による減数分裂期組換えの制御機構を、リコンビナントタンパク質を用いた生化学的解析および細胞生物学的解析によって解明することを目的とした。

3. 研究の方法

減数分裂期組換えにおける SYCP3 の機能を明らかにするために、ヒト SYCP3 をリコンビナントタンパク質として精製する系を独自に確立した。精製した SYCP3 が RAD51 および DMC1 の相同的対合反応に与える影響を試験管内相同組換え試験系を用いて解析を行った。さらに、SYCP3 が RAD51 依存的な相同組換え反応を阻害する機構について詳細な解析を行った。並行して、SYCP3 が細胞内における相同組換え効率に与える影響について細胞生物学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

SYCP3 は RAD51 依存的な相同組換え反応を抑制する

リコンビナントタンパク質として精製した SYCP3 が RAD51 および DMC1 の相同的対合反応に与える影響を試験管内相同組換え試験系を用いて解析を行った。解析では、RAD51 または DMC1 を単鎖 DNA と混合した後、両者の相同的対合反応を促進する HOP2-MND1 複合体を添加した。その後、二重鎖 DNA を加えることで相同的対合反応を開始させた。その結果、SYCP3 は RAD51 依存的な相同的対合反応を抑制するのに対し、DMC1 依存的な相同的対合反応には影響を与えないことがわかった。このことは、減数分裂期組換えにおいて、SYCP3 は RAD51 の相同的対合活性を抑制することで、DMC1 依存的な相同的対合反応を促進することを示唆している。

この阻害効果の差異が、SYCP3 との直接結合によるものかを検証するために、SYCP3 と RAD51 または DMC1 との相互作用解析を行った。解析では、SYCP3 をアミンカップリング法によって結合させたビーズを調製し、SYCP3 結合ビーズに RAD51 または DMC1 を混合した後、プルダウンアッセイを行った。SYCP3-RAD51 間もしくは SYCP3-DMC1 間の結合解析を行った結果、SYCP3 は RAD51 に効率良く結合するのに対し、DMC1 においてはその結合性が低いことを発見した。このことから、SYCP3 は RAD51 に対する結合特異性が高いことが示唆された。

次に、RAD51 の相同組換え活性阻害を担う SYCP3 のアミノ酸領域の同定を試みた。

そこで、異なる生物種間で高度に保存されている塩基性のアミノ酸領域に着目し、その領域のアラニン置換変異体を作製した。作製した SYCP3 変異体を用いて RAD51 との結合解析を行った結果、RAD51 との結合性が著しく低下することがわかった。さらに、試験管内相同組換え試験系を用いた解析により、RAD51 との結合性が著しく低下した SYCP3 変異体は、RAD51 依存的な相同対合反応を阻害しないことがわかった。以上のことから、SYCP3 は RAD51 に特異的に結合することで、RAD51 依存的な相同的対合反応を阻害することが示唆された。

細胞内における SYCP3 の機能解析

SYCP3 が細胞内における相同組換え反応に与える影響について解析を行った。解析を行うために、野生型 SYCP3 および SYCP3 変異体を HeLa 細胞に遺伝子導入し、安定発現株を樹立した。樹立した細胞を用いて、相同組換え効率を測定する DR-GFP (Direct Repeat Green Fluorescent Protein) レポーターアッセイを行った。DR-GFP レポーターアッセイでは、GFP 陽性を指標とし、細胞内の相同組換え修復の効率を測定する。DR-GFP レポーターには、制限酵素 I-SceI の認識配列を含む Sce-GFP とプロモーターを持たない iGFP が組み込まれており、I-SceI による DNA 二重鎖切断の導入により、iGFP を鋳型とした相同組換え修復が起きると GFP が発現する。

GFP 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーによって定量し、細胞内における相同組換え効率を測定した。解析の結果、生化学的解析と一致するように、野生型 SYCP3 の発現は細胞内における相同組換え効率を阻害するのに対し、SYCP3 変異体の発現は細胞内における相同組換え効率に影響を与えなかった。このことから、SYCP3 は RAD51 と結合することで、細胞内における相同組換え反応の抑制することが明らかになった。

SYCP3 は HOP2-MND1 複合体と競合することで相同的対合反応を抑制する

SYCP3 による RAD51 依存的な相同組換え反応の抑制機構の解明を試みた。HOP2-MND1 複合体は、RAD51 と直接結合し、RAD51 依存的な相同的対合反応を促進する (Petukhova et al., 2005 Nat. Struct. Mol. Biol.; Chi et al., 2007 Genes Dev.)。そこで、SYCP3 が RAD51 と HOP2-MND1 間の結合に与える影響をプルダウンアッセイにより解析した。その結果、SYCP3 は HOP2-MND1 複合体と競合し、RAD51 と結合することを見出した。以上より、SYCP3 は HOP2-MND1 複合体と競合し、RAD51 と結合することで RAD51 依存的な相同的対合反応を抑制することが明らかになった。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

シナプトネマ複合体が減数分裂期組換えの進行に必須であることは、遺伝学的解析および細胞生物学的解析によって示されていたものの、その分子機構について全くわかっていない。本研究は、シナプトネマ複合体構成因子 SYCP3 が RAD51 および DMC1 の相同組換え反応をそれぞれ負と正に制御することを生化学的解析によって世界に先駆けて明らかにしたものである。本研究成果から、減数分裂期組換えにおいて、SYCP3 は RAD51 の相同的対合反応を抑制することで、DMC1 依存的な相同的対合反応を促進するというメカニズムが考えられる。したがって、本研究で得られた成果は、減数分裂期組換えの分子機構の理解において重要な知見を与えるものである。

SYCP3 は男性不妊の原因遺伝子の一つであることが報告されており、また SYCP3 の異所的な発現と細胞のがん化との関連性が指摘されている (Miyamoto et al., 2003, *Lancet*; Hosoya et al., 2011, *EMBO rep.*)。本研究によって、SYCP3 は RAD51 と直接結合することで、RAD51 依存的な相同組換え反応を抑制することが明らかになった。したがって、SYCP3-RAD51 間の結合を阻害する薬剤は、将来、がん治療の医療分野に貢献することが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Kobayashi W, Hosoya N, Machida S, Miyagawa K, Kurumizaka H. (2017) SYCP3 regulates strand invasion activities of RAD51 and DMC1. *Genes Cells*, 22, 799-809. 査読有

[学会発表](計 6 件)

1. Kobayashi W, Kurumizaka H., Functional analysis of the synaptonemal complex component SYCP3, INDO-JAPAN Conference: Epigenetics, Human Microbiomes and Disease, 2018
2. 小林航, 石井初芽, 胡桃坂仁志, ヌクレオソーム上における RAD51 の相同鎖検索機構の解析、第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2017
3. Kobayashi W, Aihara M, Kato D, Koyama M, Saikusa K, Akashi S,

Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H., Structural and biochemical analysis of overlapping dinucleosome containing histone variants and histone modifications, EMBO Conference The Nucleosome: From Atoms to Genomes, 2017.

4. 小林航、細谷紀子、寺本睦美、町田晋一、宮川清、胡桃坂仁志、シナプトネマ複合体構成因子 SYCP3 は RAD51 および DMC1 依存的な相同組換え反応を制御する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016
5. Wataru Kobayashi, Noriko Hosoya, Mutsumi Teramoto, Shinichi Machida, Kiyoshi Miyagawa, Hitoshi Kurumizaka., The synaptonemal complex component SYCP3 regulates meiotic recombination, 10th 3R International Symposium, 2016
6. Wataru Kobayashi, Noriko Hosoya, Mutsumi Teramoto, Shinichi Machida, Kiyoshi Miyagawa, and Hitoshi Kurumizaka. SYCP3 inhibits RAD51-mediated, but not DMC1-mediated, homologous pairing DNA METABOLISM, GENOMIC STABILITY&DISEASES, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

胡桃坂研究室：
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/kurumizakalab/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 航 (KOBAYASHI Wataru)
早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号：20778063